



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 38 369 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/00
C 12 M 1/00
C 12 N 11/00

②① Aktenzeichen: 199 38 369.3
②② Anmeldetag: 9. 8. 1999
④③ Offenlegungstag: 1. 3. 2001

⑦① Anmelder:
Bier, Frank, Priv.Do. Dr., 14482 Potsdam, DE

⑦② Erfinder:
Scheller, Frieder W., Prof. Dr., 16341 Zepernick, DE;
Fürst, Dieter O., Prof. Dr., 14469 Potsdam, DE; Bier,
Frank F., Dr., 14482 Potsdam, DE; Fuhr, Günter, Prof.
Dr., 13127 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren und Vorrichtung zur Erfassung von Molekülwechselwirkungen über molekulare Motoren

⑤⑦ Zur Erfassung der Affinität von Molekülen und der Stärke ihrer Bindung werden Mikropartikel (Microbeads) mit Motorproteinen, wie Myosin, und einem Rezeptormolekül, das getestet werden soll, belegt. Diese Mikropartikel werden auf eine Oberfläche gebracht, auf der in gerichteter Form der entsprechende Motorproteinpartner (hier z. B. Aktin) aufgebracht wird und lokal oder gleichförmig verteilt ein Ligand einzufügen ist. Werden der Lösung geeignete Komponenten, insbesondere Kalziumionen und ATP, zugegeben, so bewegen sich die Microbeads, angetrieben über die Motorproteine, entsprechend der Ausrichtung der Substratbeschichtung und verändern ihr Bewegungsverhalten dort, wo der Rezeptor mit dem Liganden eine Wechselwirkung (Bindung) eingehen kann. Die Veränderung des Bewegungsverhaltens oder die Endposition der Mikropartikel bzw. ihre Verteilung auf der Substratoberfläche dient als Maß für die Charakterisierung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung und kann über bekannte Detektionsverfahren, wie Streulichtmessung oder Fluoreszenz, erfaßt werden.

Für sehr viele biotechnologische, medizinische und pharmakologische Anwendungen ist die rasche und automatisch erfaßbare Affinitäts- und Bindungsstärkemessung zwischen Molekülen, insbesondere Makromolekülen biologischer Herkunft, von fundamentaler Bedeutung. Bislang werden dazu vor allem passiv sich verbindende Systeme benutzt, bei denen ein weiterer, erkennbarer Partner an eine oder beide der zu untersuchenden Komponenten gekoppelt wird (vgl. Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie, Heidelberg-Berlin-Oxford; Spektrum Akad. Verlag, Bd. 1, S. 403). Das sind beispielsweise Mikropartikel aus Latex und andere Materialien oder chromophore Gruppen, deren Fluoreszenzsignal ein Maß für die Bindungsaffinität ist. Graduelle Unterschiede in der Bindungsstärke zu erfassen ist schwierig und setzt eine umfangreiche Meßperipherie voraus. Aus diesem Grund besteht ein immenser Bedarf an neuen hochauflösenden, automatisierbaren und rasch durchzuführenden Tests und Testsystemen.

Die Entwicklung molekularer Motoren unter Verwendung der in der Biologie bekannten Molekülgruppen wird seit längerem betrieben. Letztendlich liegt dem der Wunsch zugrunde künstliche Muskelsysteme zu entwickeln oder extrem kleine Antriebssysteme ähnlich den Flagellen der Bakterien zu entwickeln und für eine technische Nutzung zu optimieren. In der Natur gibt es zwei große Gruppen von Motorproteinen: erstens das Actomyosin-System, dessen bekannteste Ausprägung in der Muskelbewegung zu finden ist; zweitens die Mikrotubuli, die gemeinsam mit assoziierten Proteinen z. B. für die Bewegung der Cilien verantwortlich sind (vgl. Lexikon der Biochemie und Molekularbiologie, Heidelberg-Berlin-Oxford; Spektrum Akad. Verlag, Bd. 2, S. 418-424). In beiden Fällen werden durch bestimmte Stimuli (ATP, Ionen etc.) gerichtete Molekülbewegungen in Gang gesetzt. Auch in künstlichen Systemen lassen sich derartige Bewegungssysteme umsetzen. So ist bekannt, das kurze Aktinfilamente bei ATP- und Ca-Zugabe über die Suspensionslösung auf myosinbeschichteten Oberflächen bewegt werden. Die Bewegung ist 2-dimensional-stochastisch und läßt sich über Fluoreszenzmarkierung der Aktinfilamente sichtbar machen, da diese für eine Lichtmikroskopische Beobachtung zu klein sind ($< 100 \text{ nm}$).

An der Entwicklung künstlicher Motorproteine und der Modifizierung ihrer biologischen Muster wird weltweit intensiv gearbeitet.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, die passiven Affinitätsmeßprinzipien durch Einführen einer aktiven Komponente in ihrer Empfindlichkeit, Einfachheit des Aufbaus und der Bedienung sowie Auswertung der Meßsignale zu verbessern. Darüber hinaus sollen neue Meßmöglichkeiten und Anwendungsfelder geschaffen werden. Erfindungsgemäß werden Mikropartikel mittels Motorproteinbeschichtung und unter Einfügen eines oder mehrerer Rezeptoren zu einer aktiv sich bewegenden Komponente gemacht, die auf einer ebenfalls beschichteten und mit einem Liganden versehenen Substratoberfläche ihr Bewegungsverhalten in Abhängigkeit von der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung (Bindung) verändert.

Die erfinderischen Merkmale sind in den unabhängigen Ansprüchen 1, 7 und 18, sowie in den Unteransprüchen beschrieben und in den nachfolgenden Ausführungsbeispielen inhaltlich unterlegt.

Ausführungsbeispiele

Zur Erfassung der Affinität von Molekülen und der Stärke ihrer Wechselwirkung werden Mikropartikeln, vornehmlich

einer Größe im Mikrometer- und Submikrometerbereich, mit Motorproteinen, wie Myosin, und einem Rezeptormolekül, das getestet werden soll, belegt. Diese Mikropartikeln werden auf eine Oberfläche gebracht, auf der in gerichteter Form der entsprechende Motorproteinpartner (im gewählten Beispiel Aktin) in ausgerichteter Form aufgebracht wurde und lokal oder gleichförmig verteilt ein Ligand einzufügen ist. Werden der Lösung, in der die Mikropartikeln suspendiert werden, geeignete Komponenten, insbesondere Kalziumionen und ATP zugesetzt, so bewegen sich die Mikrobeads, angetrieben durch die Motorproteine, entsprechend der Ausrichtung der Substratbeschichtung und verändern ihr Bewegungsverhalten dort, wo der Rezeptor mit dem Liganden wechselwirkt bzw. eine chemische Bindung eingehen kann. Die Veränderung des Bewegungsverhaltens oder die Endposition der Mikropartikeln bzw. ihre Verteilung auf der Substratoberfläche dient als Maß für die Charakterisierung der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung.

In Fig. 1 ist das Grundprinzip einer derartigen Anordnung dargestellt. Auf einem Substrat (11) mit einer Beschichtung aus Aktin (15) werden mittels einer Suspension Mikropartikeln (12) eingespült, die auf ihrer Oberfläche Motorproteine (13, hier Myosin) und in geeigneter Konzentration einen zu testenden Rezeptor (14) tragen. Durch Zugabe von ATP und zweiwertigen Ionen in die Suspensionslösung beginnen sich die Motorproteine (13) auf dem Substrat (15) zu bewegen. Die Bewegungsbahnen sind mit (16) bezeichnet und stochastischer Natur. Über eine Lichtquelle (17) wird das Substrat samt Teilchen beleuchtet. Über einen Streulichtdetektor (18) kann das Bewegungsverhalten der Teilchen erfaßt werden. Gibt es keine Bindung zwischen dem Rezeptor (14) und dem Liganden (19), der in die Substratstrukturierung eingebracht wurde, so ändert sich das Streulichtsignal nicht oder kaum. Wechselwirken oder binden beide Moleküle, so verlangsamt sich die Mikropartikelbewegung bzw. kommt sie ganz zum Stillstand. Damit sind die Fluktuationen des Streulichtsignals ein Maß für die Affinität bzw. Bindungsstärke zwischen dem Rezeptor-Ligand-System.

Ein weiteres Beispiel ist in Fig. 2 dargestellt. Hierbei handelt es sich um einen Sensor, bei dem die Endposition der Teilchen als Maß für die Bindungsstärke der Moleküle benutzt wird. Auf ein Substrat (21) mit der in Fig. 1 beschriebenen Beschichtung werden über einen Seitenkanal (22) Motorprotein-Rezeptor-behaftete Mikropartikeln eingespült (Fließrichtung 22a). Die Elektroden (23a), ggf. auch in Kombination mit den Elektroden (23b), werden mit einer Hochfrequenzspannung im Voltbereich beaufschlagt, so daß ein inhomogenes elektrisches Feld zur Polarisation der Mikropartikeln (24) führt. Diese werden je nach Polarisationsart (positive oder negative Polarisation) an die Elektroden oder in den Zwischenraum fokussiert. Damit ist eine Startlinie formierbar. Durch Zugabe von ATP werden die Motorproteine aktiviert und die Teilchen bewegen sich stochastisch auf der Oberfläche. Gegebenenfalls kann durch Anlegen einer weiteren Kraft in Richtung (25) eine Ausrichtung der Bewegungsrichtung der Mikropartikeln erfolgen. Dies kann z. B. über weitere Elektroden und ein Elektrophoresefeld oder Dielektrophorese oder aber auch durch Zentrifugalkräfte erfolgen. Auf den Flächen (26, 27, 28) befinden sich entweder verschiedene Liganden, deren Bindung zum Rezeptor erfaßt werden soll oder eine Variation der Ligandendichte wurde vorgenommen.

Angenommen die Mikropartikeln tragen einen Rezeptor, der an den Ligand der Fläche 27 bindet, so werden alle Partikeln, die diesen Bereich auf zufälliger oder gerichtetem Wege erreichen, stationär. Es genügt folglich, nach einiger Zeit zu erfassen, an welcher Position sich ruhende Teilchen befinden. Dies läßt sich besonders leicht auf optischem

Wege und hier über Fluoreszenzdetektion bewerkstelligen.

Sinngemäß kann die Aufreihung der Partikeln auch über ein lokal appliziertes Magnetfeld erfolgen. Dementsprechend sind magnetische Partikeln mit Motorproteinen und Rezeptoren zu beschichten.

Die Bindungen, die hier beispielhaft über Rezeptor-Ligandsysteme dargestellt wurden sind weitaus breiter zu betrachten. Gemeint sind alle Makromoleküle, die spezifische Bindungen zueinander eingehen. Im diesem Sinne handelt sich auch um DNA-DNA-Interaktionen, Rezeptor-Peptide-Ligand-Systeme und analoge Kombinationen wie sie aus der Biochemie und Chemie bekannt sind.

In Fig. 3 sind beispielhaft Formvariationen und vorteilhafte Aggregatbildungen von Mikropartikeln dargestellt, die zu einer bevorzugten Bewegungsrichtung durch Orientierung der Mikropartikeln genutzt werden können. Im einzelnen sind zu sehen: Eine ellipsoide Mikropartikelform (33) mit einer Oberflächenbelegung aus Motorproteinen (32) und Rezeptormolekülen (31). Die Größe der Mikropartikeln liegt zweckmäßigerweise im Bereich von einigen 10 nm bis zu einigen Mikrometern. Ebenfalls eine deutliche Ausrichtung zeigen zylindrische Mikropartikeln (34), die in der gleichen Art belegt werden, wie bei (33) oder deren eines Ende die Rezeptoren trägt (wie hier dargestellt). Letzteres hat den Vorteil, daß die Bewegung der Motorproteine ohne Bindung der Rezeptoren besser umgesetzt werden kann.

Ganz Ähnliches läßt sich über eine tropfenförmige Form (35) oder eine Kettenbildung von Beads erreichen. Wobei diese einheitlich oder aber verschiedener Herkunft und Behandlung sein können. So könnte Bead (36a) die Rezeptoren tragen und Bead (36b) die Motorproteine. Über die Verhältnisse der Teilchenarten läßt sich auf diesem Wege jedes beliebig kompliziertere Testsystem entwickeln. In gleicher Weise können Markerteilchen eingefügt werden, die die Sichtbarmachung der Position bewerkstelligen (z. B. Fluoreszenzlicht über ein Bead mit chromophoren Gruppen).

Variationen des Musters (36) sind in (37) und (38) dargestellt, wobei hier nur noch die Größe der Teilchen verschieden gewählt wurde.

(39a) zeigt ein Teilchen das in der beschriebenen Weise beschichtet ist, jedoch ein neutrales Filament trägt (39b). Dies können Molekülketten aber auch übergeordnete Strukturen sein (Polymere, Nanotubes, etc.). Sie dienen der Ausrichtung bei der Bewegung der Mikropartikeln.

Das zuletzt vorgestellte Modell kann analog zu (36 bis 38) modifiziert werden. In (310) ist das Teilchen mit Motorproteinen beschichtet (311a), während das Filament (311b) die Rezeptoren (312) trägt. Solange diese keinen Liganden oder anderen Bindungspartner finden, bewegt sich das Teilchen nahezu ungehindert. Über die Länge und Belegung des Filaments mit Rezeptoren läßt sich in sehr kontrollierter Weise die gewünschte Bindungsstärke einstellen. An geeigneter Stelle und je nach Bedarf lassen sich auf beiden Teilen noch die zum Nachweis erforderlichen Marker einfügen oder auch weitere Filamente anfügen.

Ein weiteres Anwendungsbeispiel ergibt sich aus der Anwendung der Erfindung auf kürzlich entwickelte "DNA-" oder "Bio-Chips":

Auf solchen Chips sind Rezeptoren, z. B. DNA-Oligomere, die zu einer gesuchten Sequenz partiell oder vollständig komplementär sind, in räumlicher Anordnung fixiert. Auf einen solchen Chip wird ein statistischer Actin-Film, d. h. ohne Orientierung, aufgebracht.

Auf diesen Chip werden fluoreszierende Beads gegeben, die einerseits mit Myosin beschichtet sind, andererseits mit dem Liganden, im genannten Beispiel sind das Oligomere, die zu denen einer gesuchten längeren Sequenz komplementär sind. Die gesuchte DNA ist ebenso komplementär zu ei-

ner der immobilisierten Oligomere (Sandwich-Assay, der verhindert, daß die zu analysierende Probe markiert werden muß). Durch die Myosin-Actin Wechselwirkung wird bei Zugabe von ATP (und Ca^{2+} Ionen) die laterale Diffusion beschleunigt und gleichzeitig der Kontakt zur Oberfläche verstärkt. Dadurch wird die Hybridisierung beschleunigt.

Zusätzlich wird durch die Actin-Myosin-Wechselwirkung die Diffusion aus der Lösung zur Oberfläche forciert.

Zur Detektion ist es möglich die Abnahme der Bewegung zu verfolgen, da nicht bindende Beads über den Actin-Film geschoben werden, während bindende auf dem jeweiligen Spot festgehalten werden. Da aber die Bindung schnell abläuft kann die übliche Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Arraypunkte nach erfolgter Hybridisierung als Signal verwendet werden; ein Waschschriff ist hier aber u. U nicht erforderlich. Die Actin-unterstützten DNA-Chips sind damit auf den gleichen Scannern auswertbar, die für herkömmliche Chips eingesetzt werden.

Prinzipiell kann der Assay auch kompetitiv aufgebaut werden.

Vorteile: Schneller und empfindlicher und einfacher zu handhaben (kein Waschen) als bisherige DNA- oder Bio-Chips.

Patentansprüche

1. Verfahren und Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen, dadurch gekennzeichnet, daß

- Motorproteine wie Myosin, Aktin, Dynein oder Tubulin an Mikropartikeln gebunden werden,
- die zu testenden Rezeptormoleküle (oder Liganden) ebenfalls an diese Partikeln chemisch gekoppelt werden,
- ein Substrat mit dem entsprechenden Motorproteinantagonisten strukturiert wird,
- ein zu testender Ligand (oder der entsprechende Rezeptor) lokal oder großflächig verteilt auf dem Substrat eingefügt wird.

2. Verfahren und Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß das Bewegungsverhalten der Mikropartikel als Maß für die Affinität und/oder Bindungsstärke der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung oder zur Konzentrationsbestimmung eines Liganden, genutzt wird.

3. Verfahren zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Bewegungsgeschwindigkeit, Laufstrecke, Laufzeit, Laufrichtung und/oder Anhaftposition der Mikropartikeln oder deren Verteilung nach einer festgelegten Zeit als Maß für die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung detektiert wird

4. Verfahren zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel vor dem Start auf einen lokal begrenzten Substratbereich, eine Startlinie oder mehrere solche Bereiche fokussiert werden.

5. Verfahren zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion entweder über eine mikroskopische Beobachtung, Bildanalyse oder Markierung der Mikropartikel, wie z. B. fluoreszierende Gruppen, erfaßt wird.

6. Verfahren zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchen mit einer zusätzlichen

Kraft ausgerichtet oder in ihrem Bewegungsverhalten beeinflusst werden bzw. eine Gegenkraft soweit erhöht wird, bis die Motorproteinbewegung und damit auch die Partikelbewegung gerade kompensiert wird.

7. Verfahren und Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß Wechselwirkungen zwischen den Mikropartikeln, wie Aggregation oder Musterbildung als Maß für die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung erfaßt wird.

8. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mikrosystem, bestehend aus einem Teilcheninjektor, einer Motorproteinlaufstrecke, einer Startvorrichtung, einem oder vieler motorproteinbehafteter Mikropartikeln, einer oder mehrerer Ligandbereiche, einer Beobachtungsvorrichtung oder Detektoren besteht.

9. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß Mikrokanal und Mikroelektrodenysteme zu halbleitertechnologisch gefertigten Mikrosystemen zusammengefügt werden.

10. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Form der Mikropartikeln von der Kugelform abweicht oder sie aus mehreren Grundmaterialien bestehen oder sie in ihrer Rezeptor und/oder Markierung und/oder Motorproteinbelegung anisotrop aufgebaut sind.

11. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Bereiche gleicher oder verschiedener Rezeptormoleküle und/oder Rezeptordichte auf einem Substrat aufgebracht werden und/oder die Substratoberfläche strukturiert wird.

12. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß ein Startbereich durch Festhalten, Aufreihen oder Konzentrieren von Mikropartikeln über Mikroelektroden, Mikromagneten, Ultraschallgeneratoren oder optische Pinzetten erfolgt.

13. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erfassung der Partikelbewegung und/oder -verteilung eine Streulichtmessung, Bildauswertung, Fluoreszenzmessung, Korrelations- oder Fourieranalyse oder ein passiv elektrischer Detektor eingesetzt wird.

14. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß dielektrophoretische Kräfte zur Bewegungsbeeinflussung und Anordnung der Partikeln über Mikroelektroden erzeugt werden.

15. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Rezeptor und den Liganden noch ein oder mehrere weitere Moleküle eingefügt werden müssen, um die Bewegung der Mikropartikeln zu beeinflussen.

16. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 8 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Substratoberfläche gleichförmig, partiell oder in strukturierter Form, mit Aktin oder einem anderen Motorproteinsubstrat belegt ist, so daß sich Bewegungsbahnen, -felder, ggf. Ringsysteme und vernetzte Graphen ergeben, auf denen die Mikropartikeln sich bewegen.

17. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 8 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die erforderlichen Bewegungsbahnen durch Halbleitermikrostrukturierung der Substratoberfläche oder die Erzeugung aktinhaltiger Spuren von adhären wachsenden Zellen vorbereitet und später verstärkt, modifiziert oder vernetzt werden.

18. Vorrichtung zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen nach einem der Ansprüche 7 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mischung von Mikropartikeln zu Aggregaten formiert wird, wobei eine Partikelsorte die Motorproteine trägt, eine zweite die Rezeptoren und eine dritte die Nachweismoleküle, z. B. chromophore Gruppen aufweist oder die Partikelsorten Kombinationen der genannten Oberflächenmoleküle tragen.

19. Vorrichtung und Verfahren zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen, dadurch gekennzeichnet, daß es als Sensorsystem, diagnostisches Testsystem, Screening-set oder Sortiersystem für biotechnologische, medizinische, pharmakologische oder kolloidchemische Anwendungen, z. B. zur Konzentrationsbestimmung im kompetitiven oder Zweiseitigen-Assay Format, genutzt wird.

20. Vorrichtung und Verfahren zur Erfassung von molekularen Wechselwirkungen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Motorkomponente auf dem Substrat so verteilt wird, daß die Mikropartikel eine stochastische Bewegung ausführen und nur an lokalisierten Stellen, die mit dem Liganden (oder Rezeptor) belegt sind zum Stillstand kommen, z. B. zur Beschleunigung der lateralen Diffusion auf DNA- und Bio-Chips.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

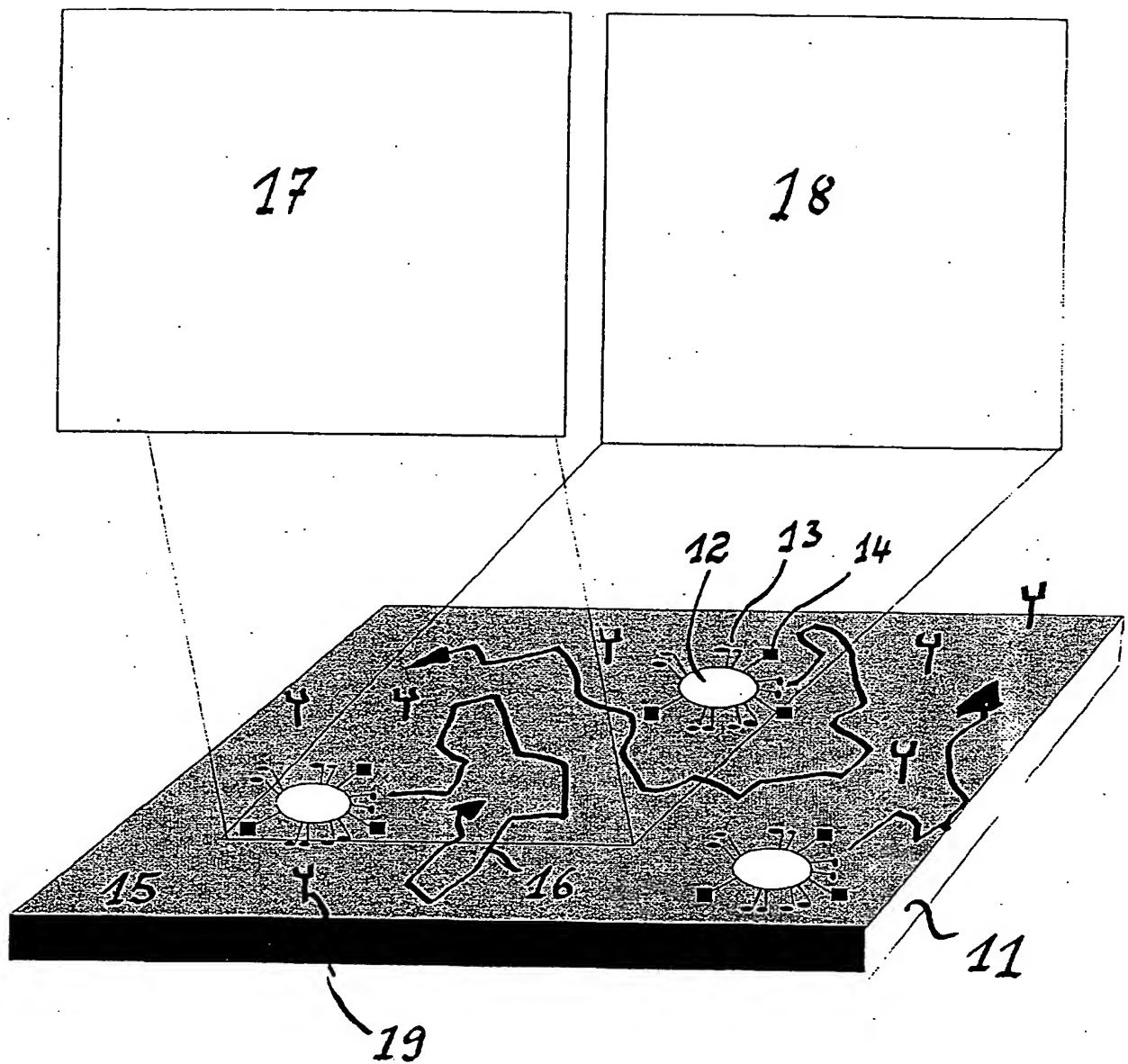


Fig. 1

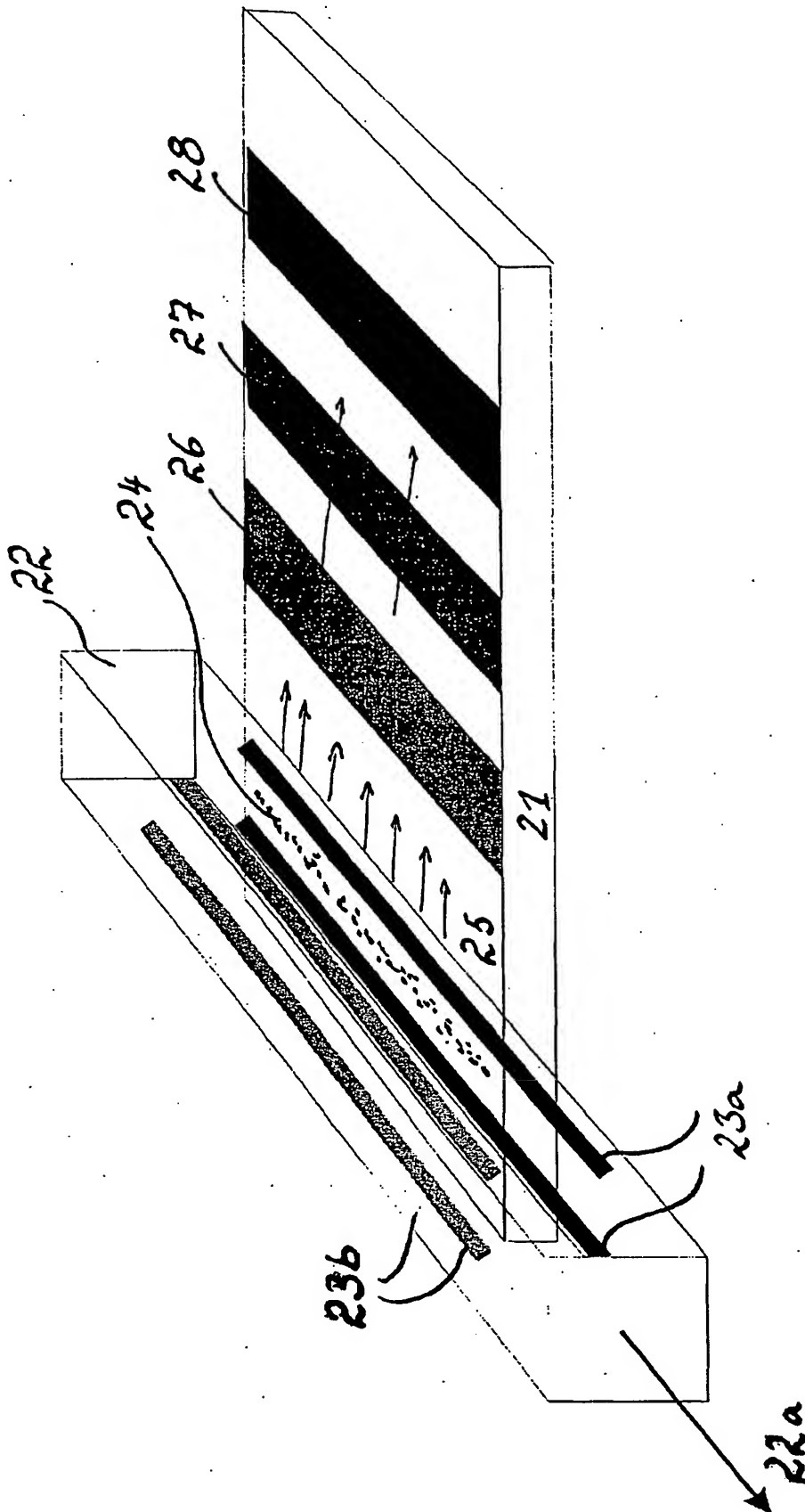


Fig. 2

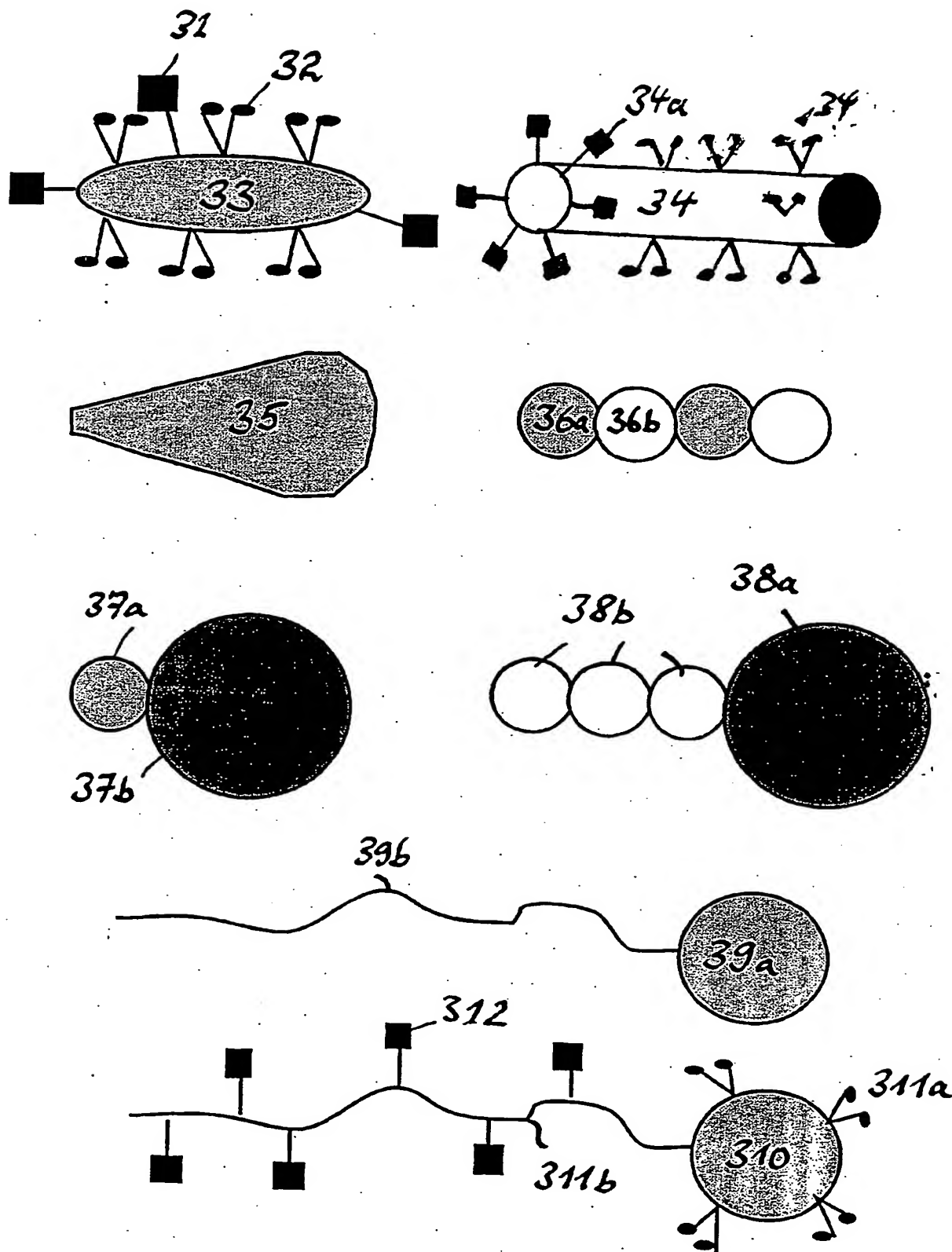


Fig. 3

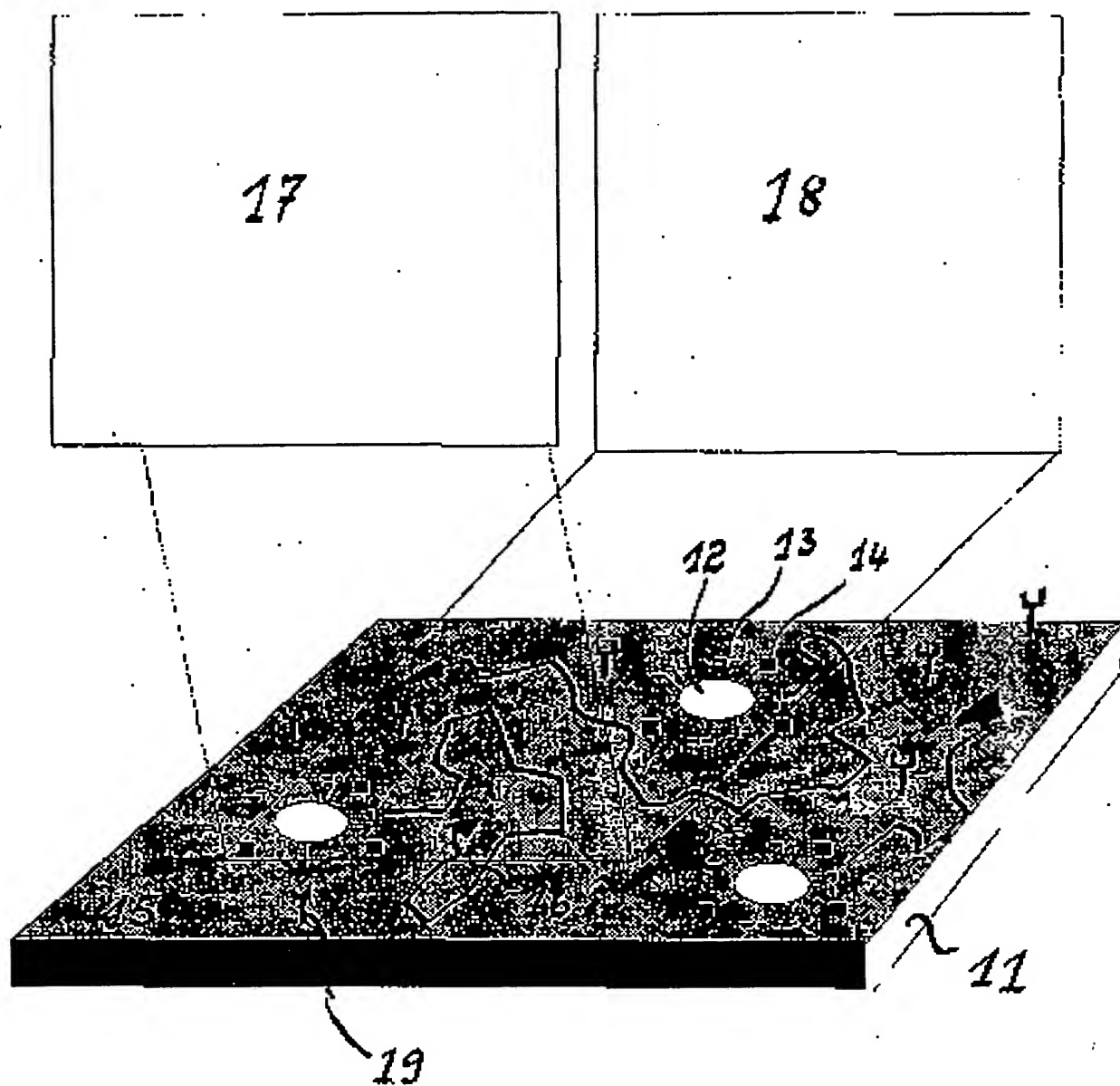


Fig. 1

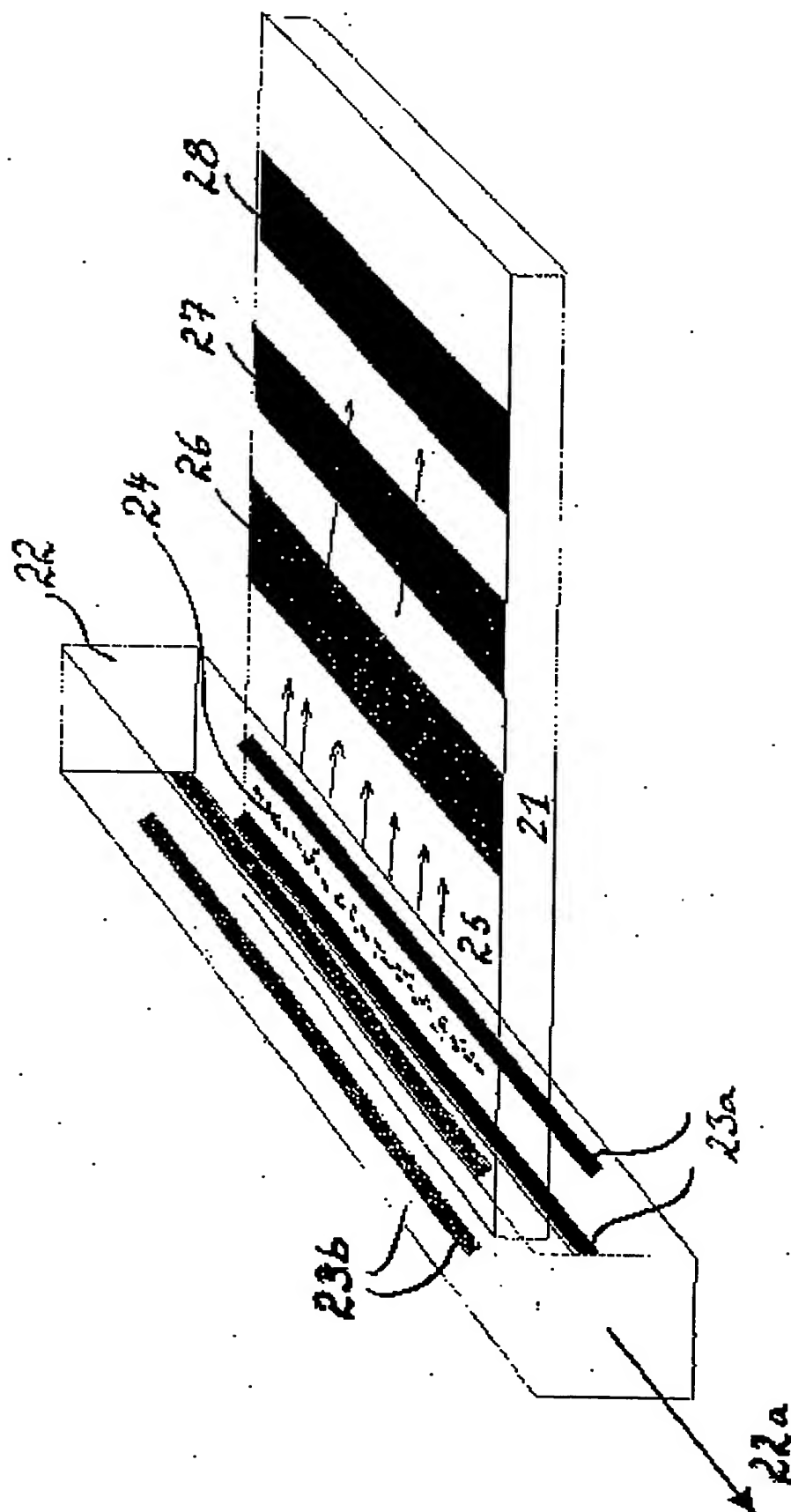


Fig. 2

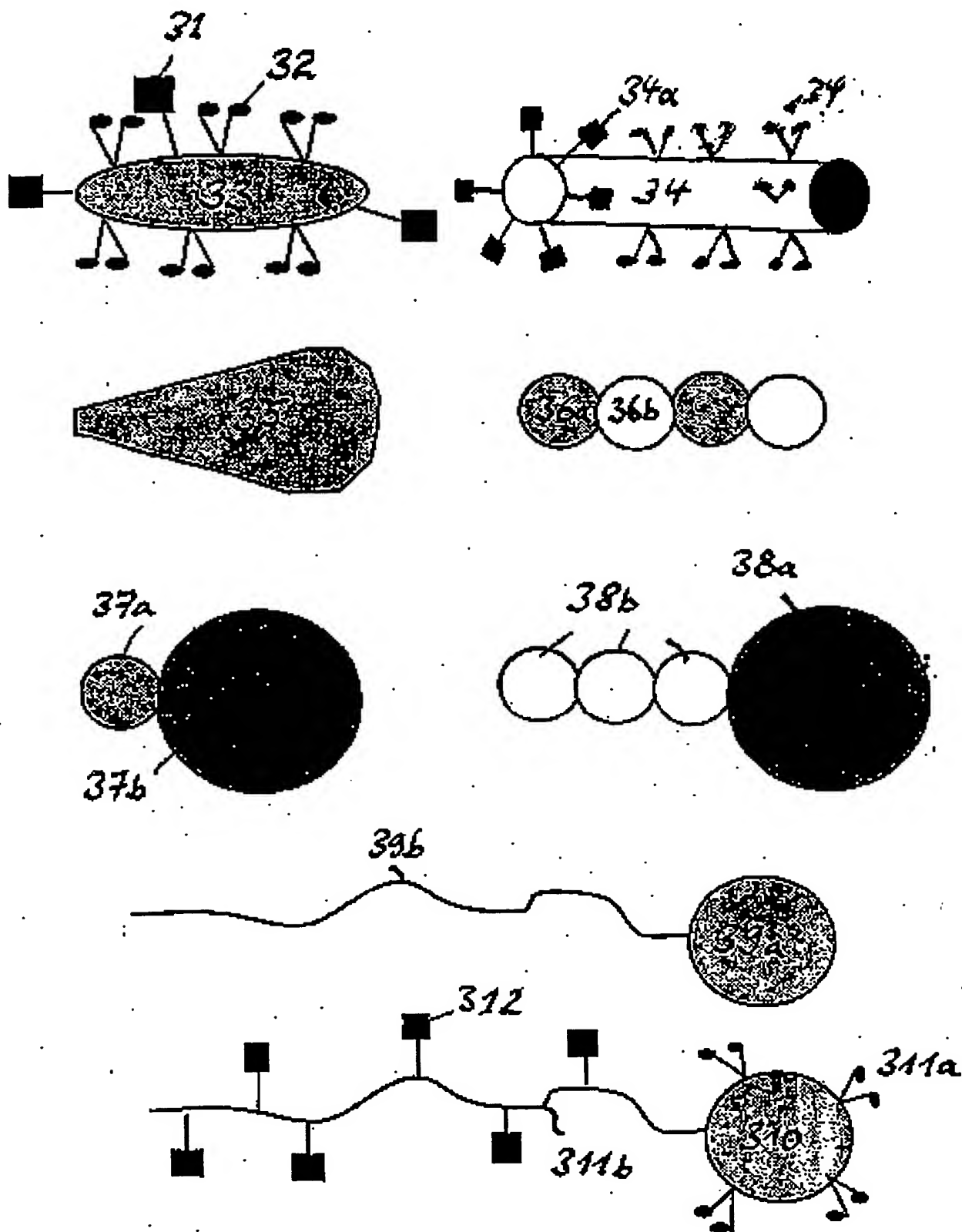


Fig. 3

